

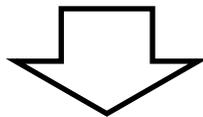
衛生微生物技術協議会  
動物由来感染症レファレンスセンター報告  
(平成23年度)

世話人： 棚林 清（感染研獣医科学部）  
(H23担当 今岡 浩一)

組 織： 山形県衛生研究所  
東京都健康安全研究センター  
愛知県衛生研究所  
京都府保健環境研究所  
長崎県環境保健研究センター  
感染研獣医科学部

## 目的と経過

動物由来感染症の実験室検査法の整備を目的に、野兔病をモデルとして抗体検出法（微量凝集反応）及び病原体ゲノム検出法（conventional PCR）についてモデル検体を用いた検査を試行し手技等の検証を実施。【平成21－22年度】



### ➤平成23年度 ブルセラ属菌の4菌種の同定

4種のプライマーセットによるPCR検査について

- ✓感染研方式の検証
- ✓各地衛研の方式での検証
- ✓模擬血清検体からの検出

## ➤ 実施結果概要

### 1. PCRの反応パターンで菌種を同定する：感染研方式 puReTaq Ready-To-Go PCR Beadsの使用

(反応例)

模擬検体1：*B. abortus* DNA溶液

模擬検体2：*B. melitensis* DNA溶液

模擬検体3：*B. suis* DNA溶液

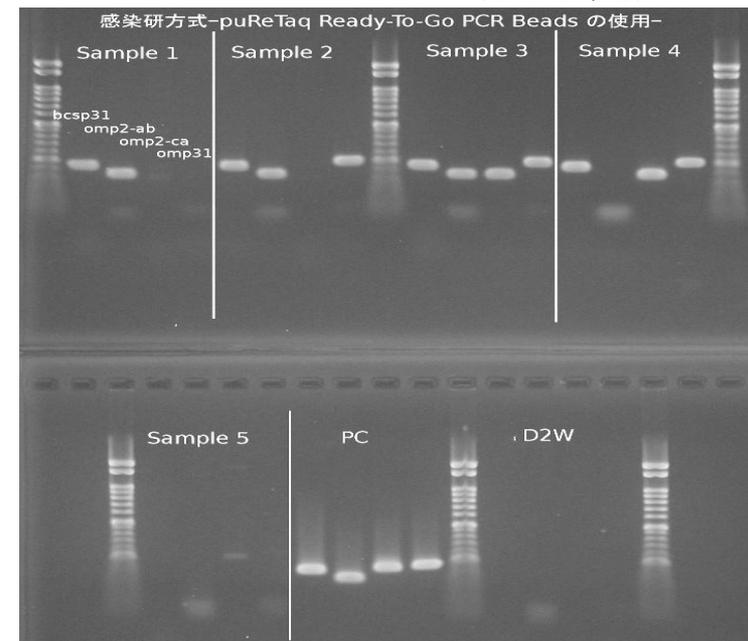
模擬検体4：*B. canis* DNA溶液

陰性対照1：*O. anthropi* DNA

陽性対照(PCRコントロール)：

増幅サイズの異なるオリゴDNA

陰性対照：D2W



いずれの機関でも当該菌種を同定できた。

## ➤ 実施結果概要

### 2. PCRの反応パターンで菌種を同定する：各地衛研方式 (各機関で通常使用しているDNAポリメラーゼの使用)

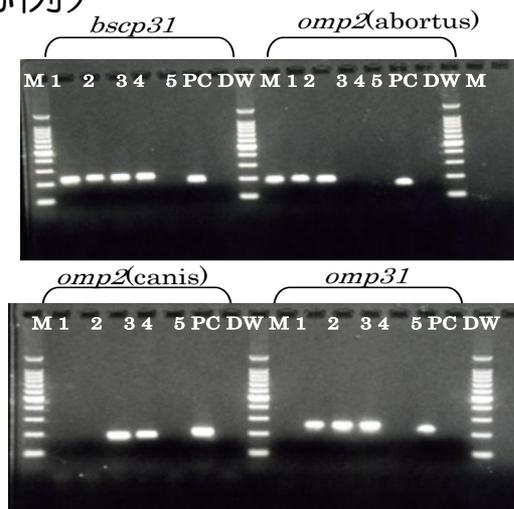
\* Takara: EX Taq, EX Taq Hot Start Version,  
Perfectshot ExTaq (loading dye mix)

\* Promega: Go-Taq colorless master mix

\* Toyobo: Blend Taq

\* Applied Bio.: AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP

(反応例)



95°C, 10min  
⇒ 35cycles ×  
(96°C, 3sec →  
65°C, 3sec →  
68°C, 5sec)  
⇒ 72°C, 10sec ⇒ 4°C

\* いずれの機関でも  
当該菌種を同定できた。  
\* AmpliTaq Gold  
Fastは、若干感度は落  
ちるが、なによりも反  
応サイクルが早い。

## ➤ 実施結果概要

### 3. 血清からのDNA抽出とPCRによるブルセラ属菌の検査 (各施設で通常使用しているDNA抽出法の使用)

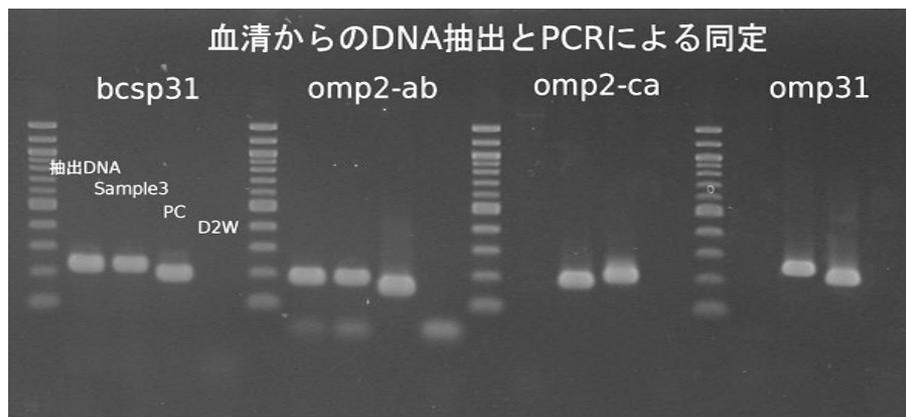
\* QIAGEN: QIAamp DNA Mini Kit - 3施設

Dneasy Blood & Tissue Kit

QIAamp MinElute Virus Spin Kit

\* エーディア: SepaGene

(反応例)



\* いずれのKitでも、  
混入している菌体の  
DNAを抽出でき、  
当該菌種を同定でき  
た。

## 平成24年度計画

### 1. 炭疽の検査の試行と検証

(炭疽菌PCR)

### 2. 野兎病やブルセラ症検査用試薬の配備

(野兎病抗体検査用：陽性対照血清、抗原菌液)

(PCR検査用：陽性対照DNA、プライマーセット)

### 3. 整備すべき動物由来感染症の検査技術等について継続的検討